

胃癌組織の組織形態形成と胃癌細胞浸潤に対するマトリクス分解酵素発現の意義

著者	佐藤 永一
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54883

博士論文

胃癌組織の組織形態形成と胃癌細胞浸潤に対する
マトリクス分解酵素発現の意義

佐藤 永一

胃癌組織の組織形態形成と胃癌細胞浸潤に対する マトリクス分解酵素発現の意義

97MD5012

佐藤 永一

1. 要約

(背景) スキルス胃癌には癌細胞のびまん性かつ単離性増殖と癌細胞の強い浸潤性(diffuse infiltrative growth), 間質結合組織の著明な増生を主要な特徴としている. 癌細胞の diffuse infiltrative growth には細胞間の接着をつかさどる E-カドヘリンや α -カテニンの発現低下が関わり, 間質結合組織の増生のメカニズムについては, 間質増生に関連する増殖因子の関与が想定されている. 一方その強い浸潤性には matrix metalloproteases (MMPs) をはじめとする細胞外基質蛋白分解酵素の関与が想定されている. しかし, ヒト癌組織での MMPs の大部分が間質細胞に由来することが示されており, その矛盾点も指摘されている. また細胞外基質蛋白分解酵素は間質結合組織の再構築を司る因子でもあり, その発現が細胞外基質蛋白の代謝回転に関与することが知られている. したがって, 癌組織での細胞外基質蛋白分解酵素の発現については従来の癌細胞の浸潤促進因子としての観点からの考察のみならず, 細胞外基質の再構築の観点も含めた多方面からの解析が必要であり, 特に間質反応に特徴のあるスキルス胃癌について, その観点からの解析が求められている.

(研究目的) スキルス胃癌の間質結合組織の増生機序を明らかにすることを目的に, ヒト胃癌組織を用い, 細胞外基質蛋白分解酵素である MMP-1, FAP/seprase, CD26, および MMPs の抑制因子である TIMP-1 並びにマトリックス合成を調べるために I 型コラーゲンの前駆体である type 1 procollagen の発現局在を検索する. さらに細胞外基質蛋白分解酵素の癌組織の発現について, 癌細胞の浸潤促進因子としての観点, および間質結合組織再構築の観点の両面から解析し, それぞれの妥当性を検討する.

(研究方法) 免疫組織化学法, 免疫電子顕微鏡法, *in situ* hybridization を用いた.

(研究結果) 癌細胞では細胞外基質蛋白分解酵素およびその抑制因子のうち,

CD26 のみ癌細胞での産生が免疫電子顕微鏡観察と *in situ* hybridization により確認されたが、他の検索対象については癌細胞での産生は確認されなかった。CD26 の癌細胞での発現は腺管構築が明瞭な癌胞巣では腫瘍腺管の内腔面に局限していたが、胞巣構築が乱れるにつれて癌細胞の基底膜側にも観察され、スキルス胃癌の癌細胞では癌細胞膜全面に発現していた。

CD26, MMP-1, FAP/seprase, TIMP-1 は免疫電子顕微鏡観察で癌間質の紡錘形細胞の粗面小胞体での局在を確認し、それら細胞による産生を確認した。それらの発現領域、発現細胞は type 1 procollagen の発現と一致していた。intestinal type の胃癌とスキルス胃癌を比較すると MMP-1 の癌間質および癌先進部での発現がスキルス胃癌で有意に低かった。

(考察) MMP-1, FAP/seprase, TIMP-1 については癌細胞での産生あるいは局在は確認されず、癌細胞の局所での浸潤促進因子とは考え難い。また同時に CD26 は間質紡錘形細胞での産生が確認され、type 1 procollagen の発現とあわせて、間質結合組織の細胞並びに細胞外基質の代謝回転に関与していると考えられた。MMP-1 の発現がスキルス胃癌で有意に低いことは、スキルス胃癌の高度な結合組織の増生を説明していた。また CD26 は癌細胞に広く発現しており、CD26 の癌細胞での発現は、癌胞巣の構造異型が著しく、より浸潤性が高いと想定されるスキルス胃癌の癌細胞では癌細胞膜全面に認められた。すなわち CD26 は特にスキルス胃癌における癌細胞の局所での浸潤性の高さに関与している可能性が示唆された。

(結論) 本研究では実際のヒト胃癌組織での細胞外基質蛋白分解酵素の発現は部分的に癌細胞の浸潤促進因子として解釈し得るが、すべてがその観点から説明可能ではないことを示した。それについては、癌間質反応としての間質結合組織の再構築という新しい概念を導入することにより、妥当な解釈が与えられた。

2. 研究背景

胃癌の大部分は腺癌である。しかし個々の症例で腺癌としての分化度は均一ではなく、しばしば多様な分化度を示す成分が種々の割合で混在し、複雑な組織像を示す。この胃癌の分類について、1965年 P. Lauren により、diffuse type と intestinal type の2型に大別することが示され、現在に至るまで胃癌分類の基本となっている¹⁾。diffuse type では癌細胞が特定の構築を取らずに、びまん性かつ単離性増殖(diffuse infiltrative growth)を示し、しばしば印環細胞の形態をとる。また間質結合組織の著明な増生を伴うことが多い。背景の非腫瘍性粘膜上皮は腸上皮化生を伴わない胃型の粘膜上皮であることが一般的であり、diffuse type の胃癌は胃固有の粘膜上皮から発生するものと考えられている²⁾。一方の intestinal type の胃癌は癌細胞が腺管を形成しながら増殖し、背景の非腫瘍性粘膜上皮には腸上皮化生を伴うことが多く、腸上皮化生からの癌化と考えられている²⁾。また間質結合組織の増生は diffuse type ほど著明ではない。本邦においては胃癌取扱い規約³⁾による組織型分類が広く適用されている。胃癌取扱い規約の分類に従うと Lauren の diffuse type には非充実型の低分化型腺癌(por2)、印環細胞癌(sig)、印環細胞から成り立つ粘液癌(muc)が属し、intestinal type には乳頭腺癌(pap)、管状腺癌(tub1, tub2)が属している。充実型の低分化型腺癌(por1)は一般にはいずれにも属しないとされる。さらに間質量の多寡、癌胞巢の浸潤増殖様式でもって細分類している。

diffuse type の進行胃癌は上述のように間質結合組織の増生があるため、肉眼的に胃壁の著明な肥厚、硬化を呈し、スキルス胃癌、あるいは硬癌とも称される。肉眼型は多くが Borrmann 4型または Borrmann 3型となる。スキルス胃

癌は予後不良で、全国胃癌登録調査報告⁴⁾によると本邦における胃癌の5年相対生存率は総数で50.6%であるが、間質が硬性型の症例では33.0%である。また増殖形式で分類するとびまん型の増殖浸潤様式を示す症例では5年相対生存率が32%であり、膨張性の増殖浸潤様式の症例での88.3%に比して著しく低いことが示されている。

スキルス胃癌の予後不良性を決定付ける因子は腹膜播種である⁵⁾。intestinal type の胃癌では転移様式として血行性転移を来することが多いのに対して、スキルス胃癌ではリンパ行性転移、腹膜播種の頻度が著しく高く、血行性転移はむしろ稀である⁶⁾。したがって intestinal type の胃癌の多くの死因が他臓器への血行性転移によるものであるのに対し、スキルス胃癌の術後癌死の多くは播種性転移による癌性腹膜炎による⁶⁾。また、スキルス胃癌の癌細胞は diffuse infiltrative growth を示すが、その機序としては細胞結合因子の E-カドヘリン^{7,8)}やその裏打ち蛋白である α -カテニン⁹⁾の発現低下が知られている。スキルス胃癌の多発家系での E-カドヘリンの遺伝子変異も報告されている¹⁰⁾。スキルス胃癌の組織像を見ると、腫瘍浸潤に伴う壊死を欠いている。intestinal type の胃癌では進行するに従い粘膜筋板や固有筋層の構築は破壊され、癌組織中心部には壊死を伴うのに対し、スキルス胃癌では広範囲に浸潤した症例でも癌組織中心部の壊死を伴うことは稀であり、粘膜筋板や固有筋層の構築は保たれている。すなわち、スキルス胃癌の細胞は既存の構築を比較的保ったままに既存の構築を分け入るように浸潤するという特徴がある。これは癌細胞の強い浸潤性を示すものと解釈される。

スキルス胃癌の特徴のひとつである間質結合組織の著明な増生のメカニズムとしては、癌細胞と線維芽細胞の相互作用により transforming growth factor β (TGF- β) や hepatocyte growth factor (HGF) 等の各種増殖因子が局所で過剰に産生され、コラーゲン産生過多の状態になることがあげられている¹¹⁻¹³⁾。コラーゲンは細胞外基質蛋白質の主要成分であり、密なネットワークを形成す

る。コラーゲン原線維間の間隙は 60nm から 70nm とされており¹⁴⁾、コラーゲンに富む細胞外基質は分子レベルの物質移動は可能であっても、細胞の移動は生じ難い環境であると想定される。癌細胞が局所で浸潤、増殖するにはコラーゲンをはじめとする細胞外基質蛋白のネットワークが何らかの要因によって疎な状態に変化する必要があり、細胞外基質蛋白質の分解はその中心的役割を果たしているものと考えられている¹⁵⁻¹⁷⁾。

Matrix metalloproteases (MMPs)は活性中心に亜鉛イオンを有するエンドペプチダーゼであり、潜在型の前駆体として細胞外に放出され、前駆体は細胞外で切断されて酵素活性を発揮する¹⁸⁾。MMPs はコラゲナーゼ群、ゼラチナーゼ群、ストロメライシン群、膜型 MMP、その他の 5 群に分類されており、いずれも何らかの細胞外基質蛋白質に対する分解能をもち、その活性は tissue inhibitor of metalloproteases (TIMPs)によって阻害される¹⁸⁾。現在に至るまで悪性腫瘍、特に癌での MMPs 発現が広く検討されており、特に癌細胞が MMPs を産生することによって局所での癌細胞浸潤が促進されとの説が示され、有力な説となっている^{16,19)}。実際に肉腫²⁰⁾、メラノーマ^{20,21)}、肺癌²²⁾の細胞株では血管基底膜や細胞外基質の構成蛋白質を含む培地で培養することにより、また乳癌細胞株は epidermal growth factor(EGF)の増殖刺激により²³⁾、MMPs の産生が増加することが示されている。さらに現在では動物実験で MMPs の阻害により癌の浸潤、転移が阻害されることが示され²⁴⁾、臨床に応用されつつある^{25,26)}。

一方で MMPs は非腫瘍性の病変、特に創傷治癒過程²⁷⁾や肝硬変²⁸⁾において、組織構築の改変に伴う間質結合組織の再構築を司る因子としても検討されている。TGF- β 、platelet derived growth factor(PDGF)、basic fibroblast growth factor(bFGF)等による増殖刺激、TIMPs 等の分解抑制因子とのバランスによって間質結合組織の改変が司られる²⁹⁾。創傷治癒過程では瘢痕組織に沈着するコラーゲン分子の架橋安定のために MMPs が要求されとの報告もあり³⁰⁾、細胞

外基質蛋白のネットワーク形成とその安定に MMPs, TIMPs が関与することが示されてきている。

上述したように実際のヒト癌組織における検討により, MMPs は多くが癌細胞ではなく, 癌間質細胞に由来することが明らかにされている. このことにより, マトリックス分解酵素が癌細胞浸潤の中心メカニズムを司るとの説との矛盾が指摘されてきている³¹⁾. この矛盾を解決するため, Heppner ら³²⁾はヒト乳癌組織での MMPs は癌細胞よりもむしろ間質の炎症細胞や血管内皮細胞に発現することを示し, MMPs の発現を腫瘍に対する生体反応の一環として論じ, また組織再構築に伴う MMPs 発現の概念を癌組織に応用する試みもなされている^{33,34)}

MMP-1 はコラゲナーゼ群に属する MMP であり, I 型, II 型, III 型, X 型コラゲンの分解能を持つ¹⁸⁾. Inoue ら³⁵⁾は胃癌組織における癌細胞の MMP-1 発現率を免疫組織化学的に検索し, リンパ節転移率, 腹膜播種率と有意に相関関係があると示している. Sakurai ら³⁶⁾は胃癌組織の MMP-1 の発現局在を免疫組織化学および *in situ* hybridization を用いて検索し, 癌細胞のみならず, 間質の線維芽細胞, 炎症細胞での発現を確認している. MMP-1 の発現はまた組織再構築の面からも検討されており, 創傷治癒過程では組織再構築の早期段階, すなわち組織の破壊と炎症が著しい段階で最も強く発現し, 肉芽組織が形成される中期段階, 瘢痕組織が完成する後期段階に進むにしたがってその発現が消退することが知られている^{30,37)}.

Fibroblast activation protein/seprase (FAP/seprase)はヒトの膠細胞および肉腫の細胞株から同定された II 型膜貫通型のセリンプロテアーゼであり, 95kDa, 97kDa のモノマーあるいは 170kDa のダイマーの構造をとる³⁸⁾. その詳細な機能は不明であるが, 癌組織間質および創傷治癒過程の線維芽細胞に発現することが示されている³⁹⁾. 癌間質線維芽細胞での FAP/seprase の発現については, 我々のグループで乳癌を用いて免疫組織化学的に解析し, その発現が強

いほど患者の長期生存率が高いことを示している⁴⁰⁾。seprase はヒト悪性黒色腫細胞株を用いた浸潤実験で浸潤部膜表面(invadopodia)に発現する膜蛋白質として同定された膜型セリンプロテアーゼであり⁴¹⁾、cDNA のクローニングによってFAPの95kDaモノマーと同一であることが確定している⁴²⁾。FAP/seprase はゼラチナーゼ活性を有する⁴¹⁾。

CD26(dipeptidyl peptidase IV)は膜型セリンプロテアーゼであり、生理的基質としてはコラーゲンを主体とするが、tumor necrosis factor α (TNF- α)や substance P 等の生理活性物質もその基質となる^{43,44)}。免疫担当細胞では活性化型T細胞に分布しているが、同時に腎尿細管上皮、胆管上皮、小腸の吸収上皮の刷毛縁に恒常的に発現し、生理活性物質の生体内への過剰な取りこみを抑制する機能があるものと考えられている⁴⁵⁾。またCD26は細胞-細胞外基質の接着分子としての機能も兼ね備えており、特にフィブロネクチンとの接着が知られている。Chengら⁴⁶⁾はラットを用いて可移植性の癌細胞株の血行性転移実験を行い、転移臓器の血管内皮細胞に発現するCD26と癌細胞表面に発現するfibronectinとの接着によって転移巣が形成されることを示している。すなわちCD26には癌の浸潤、転移を促進する因子としての性質も指摘されている。

FAP/seprase と CD26 は膜貫通型セリンプロテアーゼ(serine integral membrane proteases, SIMPs)として包括されており、いずれも癌細胞株を用いた試験管内での浸潤実験では invadopodia に発現することが確認されており^{41,47)}、局所での癌細胞浸潤を司る因子の可能性があり注目されている。

スキルス胃癌の特徴的な組織構築を形成する因子のうち、癌細胞がびまん性に浸潤する胞巣構築についてはE-カドヘリンや α -カテニンの発現低下、癌細胞の強い浸潤性については細胞外基質蛋白分解酵素の発現によって説明されている。間質結合組織の増生については癌細胞と線維芽細胞の相互作用によるものである可能性が示されているが、MMPsの関与については未だ十分な検討がなされていない。

本研究は前述のように、実際の癌組織では MMPs の大部分が間質細胞に由来し、従来からの説、すなわち MMPs が癌細胞の浸潤を促進する因子であるとの観点に対する再検討が求められている状況をふまえ、MMPs のもつ間質結合組織の再構築を司る因子であるとの観点を胃癌組織に応用し、この二つの観点のいずれが胃癌の病態をよりよく説明するかを検討するものである。ことに間質反応増生に特徴のあるスキルス胃癌の解明に力点をおきたい。

3. 研究目的

MMP-1, CD26 はスキルス胃癌で増生する間質結合組織の主成分であるコラーゲンを、また FAP/seprase はコラーゲンの変性物質であるゼラチンを主な基質としている。それらの発現の局在を検討することは、ヒト胃癌組織、特にスキルス胃癌における癌細胞の局所での浸潤機序の解明に有用である。

本研究ではヒト胃癌組織におけるそれらの発現局在の検索を行い、癌浸潤の促進因子として捉えられうるかの再検討を行うことを目的としている。加えて、一連の MMPs 研究において提唱されている間質結合組織の再構築の観点を胃癌組織に適用して考察を加えたい。

MMP-1, CD26, FAP/seprase については、癌浸潤の促進因子、あるいは間質結合組織形成因子のいずれの観点からその発現を解釈することが妥当であるかを検討するとともに、スキルス胃癌における間質結合組織の増生の機序を明らかにしたい。

4. 研究方法

(材料・材料の処理)

東北大学第一外科, 東北労災病院外科, 宮城県立がんセンターで 1988 年から 2000 年にかけて切除された進行胃癌 90 例 (スキルス胃癌 36 例, intestinal type 54 例) から検体を採取した. 1999 年以降に採取した 12 例については研究に際して informed consent を得ている.

採取した検体は periodate-lysine-4% paraformaldehyde (4%PLP) にて 5 時間から 16 時間固定した. 固定後 10% sucrose 含有 phosphate buffered saline (PBS), 15% sucrose 含有 PBS, 20% sucrose 含有 PBS にて順次各 2 時間洗浄し, O.C.T. compound (Sakura Finetek, USA) に包埋, 凍結し, 使用時まで -70°C に保存した. ブロックから $6\mu\text{m}$ の凍結切片を作製, 免疫組織化学法に供した.

同時に 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde 混合液により 16 時間固定した標本をパラフィン包埋ブロックとし, $3\mu\text{m}$ の切片を作製し, シランコートスライドガラス (松浪ガラス, 大阪) に伸展, 使用時まで 4°C で保存し, *in situ* hybridization に供した.

(1 次抗体)

免疫組織化学法に使用した抗体, 出所, 使用濃度は表 1 に示す.

(酵素抗体法による免疫組織化学)

いずれの抗体も 1% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 PBS にて使用濃度まで希釈し, 4°C で 8 時間から 16 時間抗体反応を行った. MMP-1, TIMP-1, CD26, CD10, CD13 についてはヒストファインペルオキシダーゼキット (ニチレイ, 東京) を用い, streptavidin-biotin 法により免疫組織化学染色を行った. 非特異的反応の防止のため, キットのビオチン標識抗マウス IgG + IgM + IgA 抗体は 10% の

ヒト血清を加え、4°Cにて 8 時間処理したものを用いた。type 1 procollagen については、ペルオキシダーゼ標識抗マウス F(ab)₂ (Amersham, UK)を PBS にて 100 倍に希釈した 2 次抗体を用いて間接法により免疫組織化学染色を施行した。発色には 3, 3'-ジアミノベンチジン (DAB, 同仁化学研究所, 熊本) を用いた。抽出メチル緑により核染色を行った後、風乾し、透徹封入して観察した。

(酵素抗体法による二重免疫組織化学)

Ohtani ら⁴⁸⁾に準じて CD26 とサイトケラチン (AE1/AE3) の局在を同時に観察するために免疫二重染色を施行した。

薄切した凍結切片はアセトンにて 4°C, 15 分固定した後、2 次抗体の非特異的結合を防ぐ目的で、1%BSA 含有 PBS にて 4°C, 15 分の処理を行った。CD26 抗体を 4°Cにて 16 時間反応した後、PBS で室温, 5 分間 3 回洗浄し、0.3%アジ化ナトリウム、及び 0.3%過酸化水素を含有する PBS で室温, 15 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った。PBS で室温, 5 分間 3 回洗浄し、ヒストファインキットにて免疫組織化学染色を施行した。発色には AEC キット (Vector Laboratories, USA) を用いた。発色後 0.1M グリシン塩酸 (pH2.2) にて室温 10 分間処理した後、0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) にて室温, 5 分間 2 回洗浄, PBS にて 5 分間 3 回洗浄し、1:50 に希釈した AE1/AE3 を 4°C, 16 時間反応した。PBS にて洗浄後、Envision-AP (DAKO, USA)にて室温, 45 分間反応した後、vector blue (Vector Laboratories, USA)にて発色した。カラッチのヘマトキシリンにて核染色し、水洗、水溶性封入剤を用いて封入して観察した。

(免疫電子顕微鏡観察)

MMP-1, TIMP-1, type 1 procollagen, CD26, FAP/seprase, CD10, CD13 についての超微形態観察には、それぞれを代表する定型的陽性症例に対して、Ohtani ら⁴⁹⁾に準じて pre-embedding 法による免疫電子顕微鏡観察を行った。観察対象は MMP-1, TIMP-1, type 1 procollagen, FAP/seprase には共通の intestinal type 3 例, スキルス胃癌 2 例を、CD26, CD10, CD13 には共通する intestinal type

4 例, スキルス胃癌 4 例を用いた.

6 μm で作製した PLP 固定凍結切片を PBS にて洗浄, 2 次抗体の非特異的結合を防ぐ目的で, 1%BSA 含有 PBS で 4°C, 15 分の処理を行った後, 1 次抗体反応を 4°C にて 16 時間行った. 室温 5 分の PBS 洗浄を 3 回施行し, 内因性ペルオキシダーゼのブロックを目的として, 0.3%過酸化水素/0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS にて室温, 15 分間処理した. PBS を用いて 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス F(ab)'₂ (Amersham, UK) を 2 次抗体として 4°C, 16 時間反応を行った. PBS にて室温, 5 分間 3 回洗浄し, 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) にて 0.5%に希釈したグルタルアルデヒドにて 1 分間の固定を追加した. PBS にて室温, 5 分間 3 回洗浄した後, DAB を用いて発色した. 発色後, PBS で室温, 5 分間 3 回洗浄し, 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) で 1%に調製したオスミウム酸にて後固定した. PBS で室温, 2 分間洗浄し, 99.5%エタノールにて 3 回, 無水エタノールにて 3 回洗浄して脱水した後, EPON 樹脂に包埋し, 65°C で 48 時間重合した. 重合後のブロックは実体顕微鏡下で目的領域を 1mm 角にトリミングした後, 干渉色シルバーゴールド (600 Å ~ 800 Å) の超薄切片を作成し, 鉛染色液をもちいて室温 1 分の電子染色を行い, 観察, 撮影した.

(digoxigenin 標識 RNA プローブの調製)

ヒト肝臓 cDNA (Amersham, UK) を鋳型として PCR を行い, CD26 cDNA を増幅した. CD26 cDNA の非翻訳領域に設定した 5'-CTAACTGGACTGGTTCAAATGTTGT-3' と 5'-CAGGGCAAGCTTGATGTGTTTCACATCTC-3' のオリゴヌクレオチドをプライマーとして GeneAmp PCR system 9700 (PE Biosystems, USA) を使用して PCR 反応を行い, 0.5kb の PCR 産物を得た. PCR 産物は TOPO TA cloning kit を用いて pCR-TA-TOPO にクローニングした. プラスミドの大量調製後, 制限酵素による消化によりインサート挿入を確認した. ABI PRISM cycle sequence kits および ABI prism 377 (PE biosystems, USA) を使用した塩基配列決定により, EMBL および GenBank に登録されたヒト CD26 cDNA に一致する塩基配列であることを確認した.

大量調製したプラスミドから制限酵素 EcoRI により切断した DNA 断片を pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) にサブクローニングし、プラスミド大量調製を行った。大量調製後、プラスミド DNA は制限酵素 HindIII および BamHI にて開環、直鎖化し、DIG RNA labelling kit (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて *in vitro* transcription を行い、anti-sense および sense に相当する digoxigenin 標識 RNA プローブを得た。

(*in situ* hybridization)

Ohtani ら³¹⁾に準じて、CD26 の mRNA の局在を *in situ* hybridization により検出した。

3 μ m 薄切切片は脱パラフィン後、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間、500W マイクロウェーブ照射し、20 μ l/ml proteinase (Sigma-Aldrich, UK) 中で 37°C、30 分間処理した後、100%エタノールで 5 分間 3 回洗浄して脱水した。風乾し、50%ホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション液を重畳し、50°C、16 時間反応した。ハイブリダイゼーション後、50%ホルムアミド含有 20xSSC にて、45°C、1 時間洗浄後、20 μ l/ml RNaseA にて 37°C で 30 分間処理し、さらに 50%ホルムアミド含有 2xSSC で 45°C、1 時間、50%ホルムアミド含有 1xSSC で 45°C、1 時間の洗浄を順次行った。洗浄後、0.1%blocking reagent (Boehringer Mannheim, Germany) 含有 PBS にて室温、15 分間処理し、1000 倍に希釈した抗 digoxigenin 抗体 (Boehringer Mannheim, Germany) を 4°C、16 時間反応した。発色には nitroblue tetrachloride (Boehringer Mannheim, Germany) を用いた。発色後蒸留水で室温 5 分間、3 回洗浄し、10%ホルマリンで色素固定を行い、蒸留水で洗浄、風乾、透徹封入した。

(統計学的有意差検定)

intestinal type の胃癌、スキルス胃癌のそれぞれでの各免疫組織化学染色による陽性症例率を Dr. SPSS 8.0J (SPSS, Chicago, Il) を用いて、カイ 2 乗

検定に基づくクロス集計表を作成し、2 群間の比率の差を検定した。

5. 研究結果

作製した組織切片は hematoxylin-eosin (HE) 染色にて観察し組織型を確認した。

(免疫組織化学法及び免疫電子顕微鏡法)

HE 染色にて癌中心部、癌先進部、潰瘍形成部、intestinal type において形成される癌周辺部の線維化巣を確認し、それぞれの領域の免疫組織化学反応を観察、DAB による呈色反応を示す細胞を HE 染色とあわせ見て陽性細胞を同定した。標本中に採取された各領域の内訳は表 2 に示す。

MMP-1, TIMP-1, type 1 procollagen, FAP/seprase, CD26 について陽性所見を示した症例数、および intestinal type の胃癌と diffuse type の胃癌の間での陽性症例率の差の検定結果は表 3 から表 5 に示す。いずれも間質紡錘形細胞が陽性であり、その陽性所見は癌間質、癌先進部、潰瘍底、癌周辺線維化巣いずれも同様であった (図 1 及び図 2)。免疫電子顕微鏡法にて、いずれの抗原も陽性細胞は activated fibroblasts, あるいは myofibroblasts の形態を示し、小器官としては粗面小胞体、あるいは核周囲腔が陽性であり、その細胞における産生を示した (図 3)。

表 3, 表 4 に示したように、MMP-1 発現については、間質紡錘形細胞での陽性率がスキルス胃癌で intestinal type に比し有意に低かった。TIMP-1, type I procollagen, FAP/seprase, CD26 の間質細胞における発現には両群での有意差を認めなかった。なお、type 1 procollagen の免疫組織化学染色では癌中心部間質において、intestinal type の胃癌、スキルス胃癌ともに間質紡錘形細胞に加え、細胞外基質に広く DAB の呈色反応が確認された。

CD26 は間質細胞に加えて癌細胞に陽性所見をみとめた。陽性率は intestinal type の胃癌の 54 例中 48 例(88.9%), スキルス胃癌の 36 例中 30 例(83.3%)で

あり、両群間に差はなかった（表 6）。また全癌細胞に占める CD26 陽性癌細胞の率は intestinal type の胃癌，スキルス胃癌とも全陽性症例で 70%以上の癌細胞に陽性所見を示していた。癌細胞が CD26 陰性の例においても同一組織切片内に分布する間質紡錘形細胞の陽性像が確認された。癌細胞が CD26 陽性である intestinal type の胃癌 48 のうち 10 例(20.8%)ではその発現は癌腺管内腔面に局限していたが，38 例（79.2%）の症例では癌細胞膜全面に発現し，免疫電子顕微鏡法での陽性像は癌細胞膜に明瞭に局在しており，さらに核周囲腔にも陽性所見が観察され，癌細胞による産生を証明した(図 4)。

CD26 の刷毛縁での発現をさらに検討するため，刷毛縁の形質マーカーとして CD10，および CD13 の免疫組織化学染色を施行した。intestinal type の胃癌では CD10 は 54 例中 17 例(31.5%)，CD13 は 54 例中 27 例(50.0%)の症例において癌細胞に陽性所見を示した(表 6)。その陽性像は癌腺管内腔面に分布していた。スキルス胃癌では CD10 は 36 例中 6 例(16.7%)，CD13 は 36 例中 24 例(66.7%)で癌細胞に陽性像が見られ，びまん性に浸潤する個々の癌細胞の膜表面に陽性所見が見られた。CD10，CD13 が癌細胞に陽性である症例はすべて CD26 が癌細胞に陽性であり，CD10，CD13 が癌細胞に陽性である症例は全例が CD26 が癌細胞に陽性であった。

CD10 について免疫電子顕微鏡法を施行した intestinal type の胃癌 4 例のうち 1 例で，癌細胞表面の微絨毛に一致する陽性所見が観察された。他の症例では CD10，CD13 とも癌細胞膜表面の陽性所見が観察されるものの，微絨毛の構築は確認されなかった。スキルス胃癌 4 例の免疫電子顕微鏡観察では CD10，CD13 ともに癌細胞膜表面に陽性所見を確認したが，微絨毛の構築は確認されなかった。

MMP-1，TIMP-1，CD26 については，免疫組織化学染色で癌細胞陽性像が観察された。免疫電子顕微鏡法で MMP-1，TIMP-1 については癌細胞内の粘液空胞に陽性であった。したがって MMP-1，TIMP-1 の癌細胞陽性所見は粘液物質への 1

次抗体の交叉反応であると想定され、その免疫組織化学染色像は陰性であると判断された (図 5)。

(酵素抗体法による二重免疫組織化学)

癌細胞での CD26 の発現の確認を目的に二重免疫組織化学をスキルス胃癌 3 例に施行した。いずれの例でも細胞内骨格である cytokeratin (青)によって認識される癌細胞の約 80%に CD26 (赤) が同時に陽性を示した (図 6 - a)。また、1 例ではリンパ管内に侵襲し、腺管構築を作る癌細胞で腺管内腔面に CD26 の発現が限局する像が観察された (図 6 - b)。

(*in situ* hybridization)

CD26 の messenger RNA の局在を *in situ* hybridization にて確認した。anti-sense probe によって検出される陽性所見は癌細胞と、間質紡錘形細胞の両者に確認された。それらの分布は酵素抗体法による蛋白の局在と一致した。また sense probe を用いた場合には、陽性所見は確認されなかった (図 7)。

6. 考察

本研究により、癌間質細胞における MMP-1, TIMP-1, FAP/seprase, CD26 の発現を確認し、またそれらの過剰発現が type I procollagen の発現と相関していることを示した。この結果は癌間質での細胞外基蛋白の代謝回転にそれらの酵素が関与していることを示唆した。一方、CD26 は癌間質細胞に加えて癌細胞に発現しており、ことにスキルス胃癌で癌細胞の全面に発現しており、その成立への関与が示唆された。以下これを論じてゆく。

MMP-1, TIMP-1, FAP/seprase は癌細胞には局在していなかった。これらが癌細胞自身の産生による局所での癌細胞浸潤の促進因子、あるいは抑制因子であるとはみなしがたい。Inoue ら³⁵⁾の報告では癌細胞が免疫組織化学的に MMP-1 陽性を示すことを報告している。また Sakurai らの報告³⁶⁾では、MMP-1 は癌細胞に免疫組織化学法で陽性であるが *in situ* hybridization では mRNA の局在は

癌細胞が観察されず、それを癌細胞による MMP-1 の産生量が少ないものとして論じており、いずれの報告も本研究の結果と相反していた。本研究でも光学顕微鏡レベルの免疫組織化学法では癌細胞に陽性像を確認したが、免疫電子顕微鏡法で癌細胞での産生は確認されなかった。免疫電子顕微鏡法で得られた像は何らかの要因による抗体の交叉反応による偽陽性と判断され、Inoue ら、および Sakurai らの研究ではそれを捉えた可能性が示唆された。また Inoue ら、および Sakurai らはホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いており、また用いたモノクロナル抗体のクローンも我々の使用した抗体と異なっており、それにより、非特異的な抗体反応が生じた可能性もある。一方で Sakurai らの観察では間質紡錘形細胞に MMP-1 は蛋白、mRNA とも局在することを示しており、本研究の観察結果と合致していた。

癌細胞には発現されていなかった MMP-1, TIMP-1, FAP/seprase については、陽性細胞の主体は癌間質の紡錘形細胞であった。これは先行論文の結果 (36, 39, 50) に一致するものである。我々はさらに免疫電顕による陽性細胞の同定をおこない、activated fibroblasts, あるいは myofibroblasts によりそれらが産生されていることも示した。CD26 は癌細胞への陽性所見に加えて、間質の紡錘形細胞に陽性所見を示した。本研究の成果のひとつはこれらの陽性所見が type 1 procollagen の発現様式と同様であったことであり、それにより、これらの蛋白分解酵素は細胞外基質の代謝回転に関与していることが示唆された。癌の中心部間質をみると、細胞外基質産生の因子である type 1 procollagen, および分解の抑制因子である TIMP-1 は intestinal type の胃癌、スキルス胃癌ともに間質紡錘形細胞に広く発現が観察され、両群間で陽性率に有意差はなかった。細胞外基質分解側の因子では、FAP/seprase あるいは、CD26 が陽性の間質紡錘形細胞には両群間で発現率に有意差はなかったが、MMP-1 についてのみ、スキルス胃癌で有意に発現率が低かった。細胞外基質蛋白質の代謝回転の立場から、この観察事実をスキルス胃癌の成立と関連してさらに考察した。

MMP-1 は創傷治癒の際、組織再構築の早期段階、すなわち組織の破壊と炎症が著しい段階やそれにつづく肉芽組織が形成された段階で発現することが知られている³⁰⁾。癌組織中に形成された潰瘍底を観察すると、そこに形成される肉芽組織においては、細胞外基質産生側の因子である type 1 procollagen, 及び細胞外基質分解側の因子である MMP-1, FAP/seprase, CD26, さらに細胞外基質分解の阻害因子である TIMP-1 のいずれも同時に発現がみられた。これは潰瘍底での細胞外基質の代謝回転では、産生、分解、そして分解の抑制の三者がいずれも亢進していることを示唆している。このことは炎症性腸疾患でも成立することを我々のグループで観察している⁵¹⁾。intestinal type の胃癌の中心部間質でも三者がいずれも発現しており、潰瘍底の肉芽組織に類似する細胞外基質環境が形成されていると想定された。それにたいして、MMP-1 の発現がほとんど見られないスキルス胃癌においては、TIMP-1, type-1 procollagen の発現が広く確認され、細胞外基質回転のバランスが細胞外基質分解の抑制側に傾いていると考えられた。また MMP-1 の発現低下は創傷治癒過程での瘢痕形成期に見られることもあわせ見て、そのバランスが基質分解抑制に傾いたため、線維性コラーゲンの過剰な沈着が生じたと考えられた。

intestinal type の胃癌の周辺に形成される線維化巣では MMP-1 の発現は 1 例に確認されたのみであり、type-1 procollagen, FAP/seprase, TIMP-1 が広く紡錘形細胞に陽性所見を示した。潰瘍形成部の肉芽組織に発現する MMP-1 の発現がほとんど確認されず、細胞外基質の代謝回転が癌中心部の間質と比較して、産生側、および分解の抑制側に傾いていることが示唆され、また CD26 については、癌中心部の間質にくらべて、この領域においてより強くその発現が確認された。CD26 が線維化の過程の細胞外基質代謝回転に関与していることが示唆された。

intestinal type においては、癌中心部間質は潰瘍底肉芽組織に類似した性状を示しており、創傷治癒過程の早期段階の状態に類似する間質の性状である

ことが示された。一方でスキルス胃癌においては、間質の性状は通常の創傷治癒過程の中期から晩期、すなわち MMP-1 の発現が減退し、collagen 沈着の段階に至った時期の間質性状に類似していた。MMP-1, TIMP-1, FAP/seprase, CD26 は、type-1 procollagen と比較することにより、間質結合組織の再構築における蛋白分解酵素の関与と解釈することが妥当であるとみなされた。ここに細胞外基質蛋白分解酵素を癌細胞の浸潤促進因子としての観点を補足し得る新たな解釈の可能性が示された (図 8)。

CD26 は間質紡錘形細胞とともに、intestinal type の胃癌、スキルス胃癌ともに大部分の症例において癌細胞が陽性所見を呈していた。CD26 の癌細胞における発現をみると、CD26 陽性の intestinal type 胃癌のうち 20.8% の症例では癌腺管の内腔面に局在していたが 79.2% は癌細胞の基底側の膜表面にも陽性所見を示した。これは癌腺管の構築の乱れと対応しており、より高度の構造異型を示す癌腺管を形成する症例で癌細胞膜全面に CD26 の陽性像が見られた。さらに著明な構造異型を示すスキルス胃癌では全例で癌細胞膜全面に CD26 が発現していた。さらにスキルス胃癌細胞であってもリンパ管内に侵襲し、腺管構築を形成する細胞では、その腺管内腔面に CD26 発現が限局する所見が確認され、癌腺管構築と CD26 の発現様式に一定の相関性があることが示唆された。CD26 は刷毛縁に恒常的に発現する蛋白質であり、癌における CD26 発現も、刷毛縁の形質を模倣した癌細胞の形質である可能性がある。そこで同じく刷毛縁に恒常的に発現する CD10 および CD13 の発現を検討した。いずれも癌細胞での陽性所見が intestinal type の胃癌、スキルス胃癌ともに一部の症例で確認され、それらの症例は CD26 の癌細胞陽性症例と一致した。ただし、CD26 陽性症例の多くは CD10, CD13 とも陰性であり、また免疫電子顕微鏡法にて CD26, CD10, CD13 の陽性癌細胞は CD10 における intestinal type の 1 例を除いて、刷毛縁の構築は確認されないことから、CD26 の癌細胞での発現は刷毛縁としての形質とは独立した現象であると考えた。CD26 は蛋白分解酵素としての性質と、細胞-細胞

外基質間の接着分子としての機能を兼ね備える分子でもある。この二つの性質により、スキルス胃癌の癌細胞が増生した間質結合組織のネットワーク内にびまん性に浸潤する能力を獲得していることが示唆された。

癌の間質が肉芽組織に類似していることは、すでに指摘されており⁵²⁾、また創傷治癒過程との比較において癌間質の性状を検討した報告もある³⁴⁾。intestinal type においては、それらの先行研究の論考にほぼ一致する結果が得られた。肉芽組織に類似した疎な間質の環境が形成されることは、癌細胞の増殖、さらには浸潤において有利な環境であると考えられた。

しかし、intestinal type よりも浸潤性が高いスキルス胃癌においては、間質の環境はむしろ硬く緻密な性状であることが示唆される結果であった。この環境は癌細胞の増殖浸潤においては不利と考えられた。スキルス胃癌の癌細胞には、intestinal type に比べてより強い浸潤能力が要求されると想定された。CD26 の分布がスキルス胃癌において、癌細胞膜全面に発現することは、より硬く緻密な間質にびまん性に浸潤する癌細胞の強い浸潤能力をつかさどる因子と考えられた。

CD26 の癌細胞陽性像は intestinal type の胃癌の 88.9%、スキルス胃癌の 83.3%に観察されたが、癌細胞陰性症例もそれぞれ 11.1%、16.7%含まれていた。これら CD26 癌細胞陰性症例には組織構築の上で CD26 癌細胞陽性症例との比較で差異は指摘されなかった。それら CD26 癌細胞陰性症例については今後のさらなる解析が必要となる。

本研究の結果は先行する試験管内での実験結果から得られた仮説、すなわち癌細胞が蛋白分解酵素を産生して局所で浸潤するとの説に合致しない面が多く示された。先行研究も本研究も実験方法、観察方法からは artifact を観察しているものとは考え難いので、この解離の原因は別に求められなければならない。試験管内の環境と実際の癌組織の環境は異なるために癌細胞の発現形質に相違が生じた可能性が考えられる。また、試験管内での結果と同様にふるまう癌細

胞は実際の癌組織ではごくわずかであるため捉えられない可能性もある。これらの点に対しては、組織再構築の立場、すなわち細胞外基質蛋白質の代謝回転の観点からの解釈が妥当であることを示した。また CD26 についてはこれまでの試験管内での実験結果から得られた仮説と合致するものであり、スキルス胃癌の成立の鍵が一つ見つかったことが示された。

7. 結論

ヒト胃癌組織にあつては、MMP-1, TIMP-1, FAP/seprase は癌細胞には発現が観察されず、癌細胞自身によって産生される浸潤促進因子、あるいは抑制因子とは解釈できなかった。それらの主たる発現は間質細胞にあり、type-1 procollagen の発現とあわせ見て、間質結合組織の代謝回転の観点を導入することにより妥当性のある説明ができた。スキルス胃癌の間質結合組織の増生は、それらの発現バランスによって説明された。CD26 については間質紡錘形細胞に発現し、その発現は間質結合組織の代謝回転の立場から説明できるが、一方で、癌細胞にも広く発現していた。CD26 の発現は癌細胞の構造異型が著しくなるにつれて癌細胞膜全面に分布していた。CD26 は蛋白分解酵素としての機能、接着分子としての機能を併せ持つ分子であり、間質結合組織の代謝回転に加えて、特にスキルス胃癌における癌細胞の局所での浸潤性の高さをつかさどっていることが示唆された。

8. 文献

1. Lauren, P. (1965) The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 64, 31-49.
2. Lauren, P. (1991) Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. Scand. J. Gastroenterol. Suppl., 180, 160-164.
3. 日本胃癌学会 (1999) 胃癌取扱い規約 13 版. 金原出版, 東京, pp.63-84.
4. 胃癌研究会 (1997) 全国胃癌登録調査報告第 47 号. 三輪胃癌登録研究所, 東京, pp.70-72.
5. Yokota, T., Teshima, S., Saito, T., *et al.* (1999) Borrmann's type IV gastric cancer: clinicopathologic analysis. Can. J. Surg., 42, 371-376.
6. Hamy, A., Letessier, E., Bizouarn, P., *et al.* (1999) Study of survival and prognostic factors in patients undergoing resection for gastric linitis plastica: a review of 86 cases. Int. Surg., 84, 337-343.
7. Shimoyama, Y., Hirohashi, S. (1991) Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. Cancer Res., 51, 2185-2192.
8. Mayer, B., Johnson, J. P., Leitl, F., *et al.* (1993) E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. Cancer Res., 53, 1690-1695.
9. Ochiai, A., Akimoto, S., Shimoyama, Y., *et al.* (1994) Frequent loss of α catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth. Jpn. J. Cancer Res., 85, 266-273.
10. Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., *et al.* (1998) E-cadherin germline

- mutations in familial gastric cancer. *Nature*, 392, 402-405.
11. Mahara, K., Kato, J., Terui, T., *et al.* (1994) Transforming growth factor β 1 secreted from scirrhous gastric cancer cells is associated with excess collagen deposition in the tissue. *Br. J. Cancer*, 69, 777-783.
 12. Yashiro, M., Chung, Y. S., Kubo, T., *et al.* (1996) Differential responses of scirrhous and well-differentiated gastric cancer cells to orthotopic fibroblasts. *Br. J. Cancer*, 74, 1096-1103.
 13. Inoue, T., Chung, Y. S., Yashiro, M., *et al.* (1997) Transforming growth factor- β and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 152-159.
 14. Piez, K. A., Reddi, A. H. (1984) *Extracellular matrix biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, p542.
 15. Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., *et al.* (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284, 67-68.
 16. Liotta, L. A., Wewer, U., Rao, N. C., *et al.* (1988) Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastases. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 256, 3-16.
 17. Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., Liotta, L. A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9, 541-573.
 18. Nagase, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.*, 378, 151-160.
 19. Furcht, L. T., Skubitz, A. P., Fields, G. B. (1994) Tumor cell invasion, matrix metalloproteinases, and the dogma. *Lab. Invest.*, 70, 781-783.
 20. Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Rao, C. N., *et al.* (1986) Laminin

- increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 1883-1889.
21. Yamamura, K., Kibbey, M. C., Kleinman, H. K. (1993) Melanoma cells selected for adhesion to laminin peptides have different malignant properties. *Cancer Res.* 53, 423-428.
22. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., *et al.* (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 370, 61-65.
23. Kondapaka, S. B., Fridman, R., Reddy, K. B. (1997) Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 70, 722-726.
24. Shalinsky, D. R., Brekken, J., Zou, H., *et al.* (1998) Antitumor efficacy of AG3340 associated with maintenance of minimum effective plasma concentrations and not total daily dose, exposure or peak plasma concentrations. *Invest. New Drugs*, 16, 303-313.
25. Brown, P. D. (1999) Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. *Apmis*, 107, 174-180.
26. Drummond, A. H., Beckett, P., Brown, P. D., *et al.* (1999) Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 878, 228-235.
27. Parks, W. C. (1999) Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen.*, 7, 423-432.
28. Lichtinghagen, R., Breitenstein, K., Arndt, B. (1998) Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver. *Virchows Arch.*, 432, 153-158.
29. Iredale, J. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 43-54.

30. Paul, R. G., Tarlton, J. F., Purslow, P. P., *et al.* (1997) Biomechanical and biochemical study of a standardized wound healing model. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 211-220.
31. Ohtani, H., Motohashi, H., Sato, H., *et al.* (1996) Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by *in situ* hybridization and immunoelectron microscopy. *Int. J. Cancer*, 68, 565-570.
32. Heppner, K. J., Matrisian, L. M., Jensen, R. A., *et al.* (1996) Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.*, 149, 273-282.
33. Gress, T. M., Muller-Pillasch, F., Lerch, M. M., *et al.* (1995) Expression and *in-situ* localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 62, 407-413.
34. Ohtani, H., Nagai, T., Nagura, H. (1995) Similarities of *in situ* mRNA expression between gelatinase A (MMP-2) and type I procollagen in human gastrointestinal carcinoma: comparison with granulation tissue reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 86, 833-839.
35. Inoue, T., Yashiro, M., Nishimura, S., *et al.* (1999) Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int. J. Mol. Med.*, 4, 73-77.
36. Sakurai, Y., Otani, Y., Kameyama, K., *et al.* (1997) Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) in gastric cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 401-406.
37. Sun, Y., Zhang, J. Q., Zhang, J., *et al.* (2000) Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 135, 316-323.

38. Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., Beresford, H. R., *et al.* (1988) Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 3110-3114.
39. Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., *et al.* (1994) Molecular cloning of fibroblast activation protein α , a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 5657-5661.
40. Ariga, N., Sato, E., Ohuchi, N., *et al.* (2001) Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast. *Int. J. Cancer*, (in press).
41. Pineiro-Sanchez, M. L., Goldstein, L. A., Dodt, J., *et al.* (1997) Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J. Biol. Chem.*, 272, 7595-7601.
42. Goldstein, L. A., Gherzi, G., Pineiro-Sanchez, M. L., *et al.* (1997) Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 1361, 11-19.
43. Ahmad, S., Wang, L., Ward, P. E. (1992) Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, 1257-1261.
44. Bauvois, B., Sanceau, J., Wietzerbin, J. (1992) Human U937 cell surface peptidase activities: characterization and degradative effect on tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Immunol.*, 22, 923-930.
45. Bouras, M., Huneau, J. F., Luengo, C., *et al.* (1995) Metabolism of enterostatin in rat intestine, brain membranes, and serum: differential involvement of

- proline-specific peptidases. *Peptides*, 16, 399-405.
46. Cheng, H. C., Abdel-Ghany, M., Elble, R. C., *et al.* (1998) Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 273, 24207-24215.
 47. Chen, W. T. (1996) Proteases associated with invadopodia, and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzyme Protein*, 49, 59-71.
 48. Ohtani, H., Naito, Y., Saito, K. *et al.* (1997) Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible antitumor immunity? *Lab. Invest.*, 77, 231-241.
 49. Ohtani, H., Tabata, N., Nagura, H. (1995) Immunoelectron microscopic localization of gelatinase A in human gastrointestinal and skin carcinomas: difference between cancer cells and fibroblasts. *Jpn. J. Cancer Res.*, 86, 304-309.
 50. Ohtani, H. (1998) Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol. Int.*, 48, 1-9.
 51. Arihiro, S., Ohtani, H., Hiwatashi, N. *et al.* (2001) Vascular smooth muscle cells / pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease : significance of the balance of matrix production and degradation. *Histopathol.*, (in press).
 52. Dvorak, H. F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315, 1650-1659.

図の説明

図 1. 免疫組織化学染色の結果 (intestinal type の胃癌)

癌組織中心部での観察結果 (x400). a. (MMP-1) 一部癌細胞 (矢頭), および間質紡錘形細胞 (矢印) に陽性像が確認された. b. (FAP/seprase) 癌間質の紡錘形細胞に陽性像が確認されたが (矢印), 癌細胞は陰性であった. c. (CD26) 癌細胞 (矢頭) と間質紡錘形細胞 (矢印) に陽性所見を確認した. 同時に一部リンパ球も陽性像を示した. d. (TIMP-1) 一部癌細胞 (矢頭), および間質紡錘形細胞 (矢印) に陽性像が確認された. e. (type 1 procollagen) 間質細胞の陽性像 (矢印) とともに細胞外基質に広く DAB の示色反応が観察された.

図 2. 免疫組織化学染色の結果 (スキルス胃癌)

固有筋層間に浸潤した, 癌浸潤先進部領域での観察結果 (x400). a. (MMP-1) 一部癌細胞に陽性所見が確認されるが (矢印), 間質細胞に陽性像は確認されない. b. (FAP/seprase) 紡錘形の形態を示す間質細胞に陽性像が確認される (矢印) c. (CD26) 癌細胞 (矢頭) とともに間質細胞 (小円形細胞や紡錘形細胞, 矢印) に陽性像が確認される. d. (TIMP-1) 紡錘形の間質細胞に陽性所見が確認される (矢印). e. (type 1 procollagen) 間質細胞の陽性像 (矢印) とともに細胞外基質に広く DAB の示色反応が観察された.

図 3. 間質紡錘形細胞の免疫電子顕微鏡像

a. MMP-1, b. FAP/seprase, c. CD26, d. TIMP-1, e. type 1 procollagen のいずれも activated fibroblast あるいは myofibroblast の形態を示し, その粗面小胞体 (矢印), あるいは核周囲腔 (矢頭) に陽性所見が確認された.

図 4. CD26 陽性癌細胞

a. 免疫組織化学染色 (x400) 固有筋層の間にびまん性に浸潤する癌細胞に広く癌細胞全面性の CD26 陽性像を認めた (矢印). b. 免疫電子顕微鏡法では細胞膜上 (矢印) に陽性所見がされると同時に, 核周囲腔 (矢頭) にも陽性像が確認された.

図 5. MMP-1 陽性癌細胞の免疫電子顕微鏡像

MMP-1 は免疫組織化学染色で癌細胞に陽性所見を示したが, 免疫電子顕微鏡で観察するとその陽性所見は癌細胞内の粘液空胞に局在していた (矢印). 粗面小胞体, あるいは核周囲腔での陽性所見は確認されなかった.

図 6. Cytokeratin と CD26 の免疫二重染色

いずれも 1000 倍での観察. a. 上皮細胞骨格(cytokeratin)で標識される癌細胞 (青)のうち約 80%の細胞が CD26(赤)の陽性像を同時に示した. 矢頭: cytokeratin 単独陽性細胞, 矢印: cytokeratin と CD26 の二重陽性細胞. b. リンパ管侵襲部で未熟な腺管を形成した成分では CD26 の発現が腺管内腔側に局在していた.

図7. CD26 の *in situ* hybridization

いずれも 400 倍での観察. a. intestinal type の胃癌で anti-sense probe を用いた場合のシグナルは癌細胞, 間質紡錘形細胞に観察され, 免疫組織化学染色での蛋白局在と一致した. b. sense probe. c. diffuse type の胃癌でも anti-sense probe で得られるシグナルは癌細胞, 間質紡錘形細胞に観察され, 免疫組織化学染色での蛋白局在と一致した. d. sense probe. b.d. sense probe を用いた場合, シグナルは観察されなかった.

図8. 細胞外基質蛋白分解酵素の発現についての新たな解釈の可能性

細胞外基質蛋白分解酵素の発現を細胞外基質蛋白の代謝回転の観点から解釈すると, intestinal type の胃癌の間質は創傷治癒過程の比較的早期の段階に類似し, diffuse type の胃癌の間質はより線維化が進行した段階の間質に類似するとの解釈が可能である.

a. MMP-1
b. FAP/seprase
c. CD26
d. TIMP-1
e. type I procollagen

図1

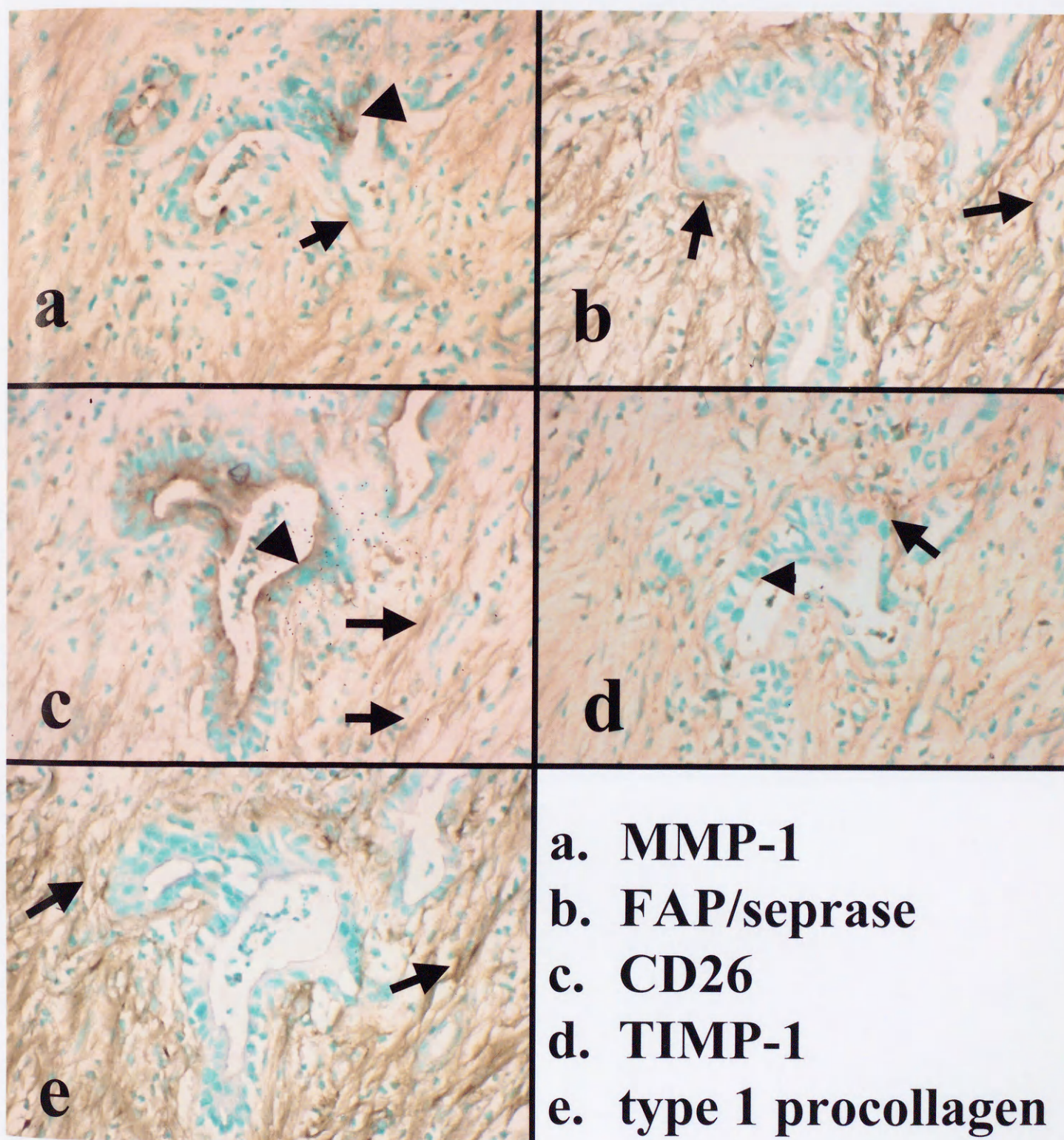


图1

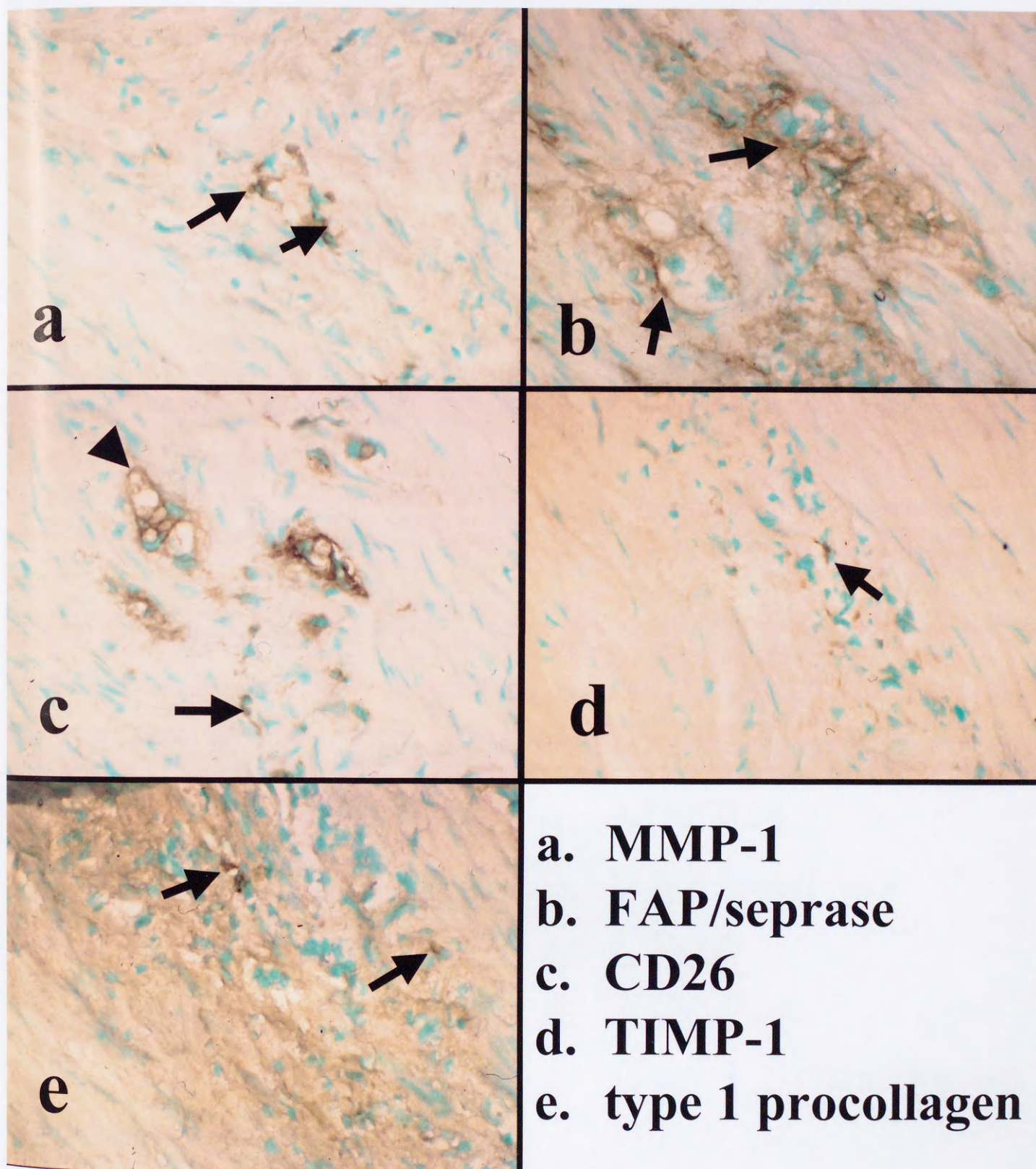


图2

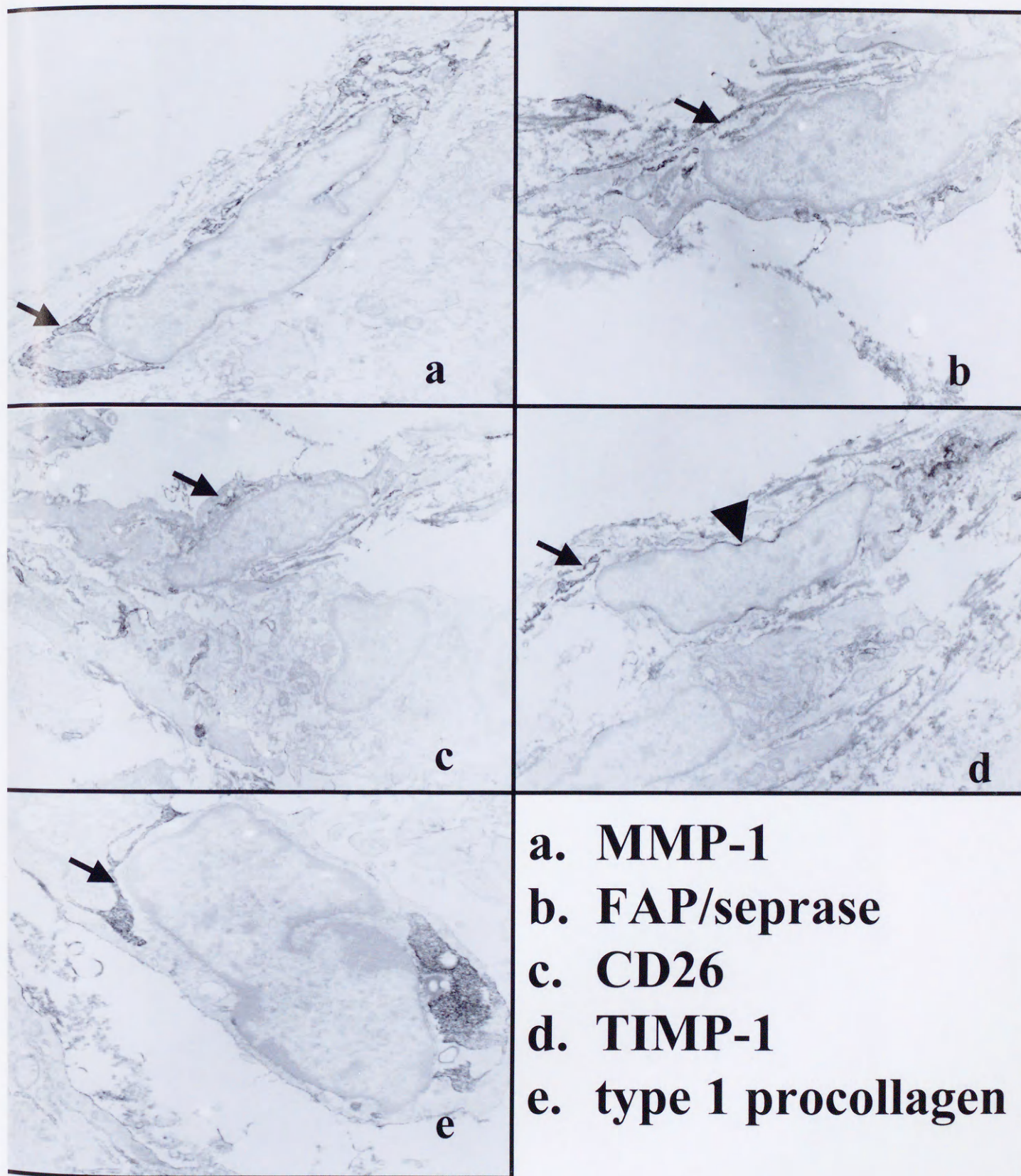


图 3

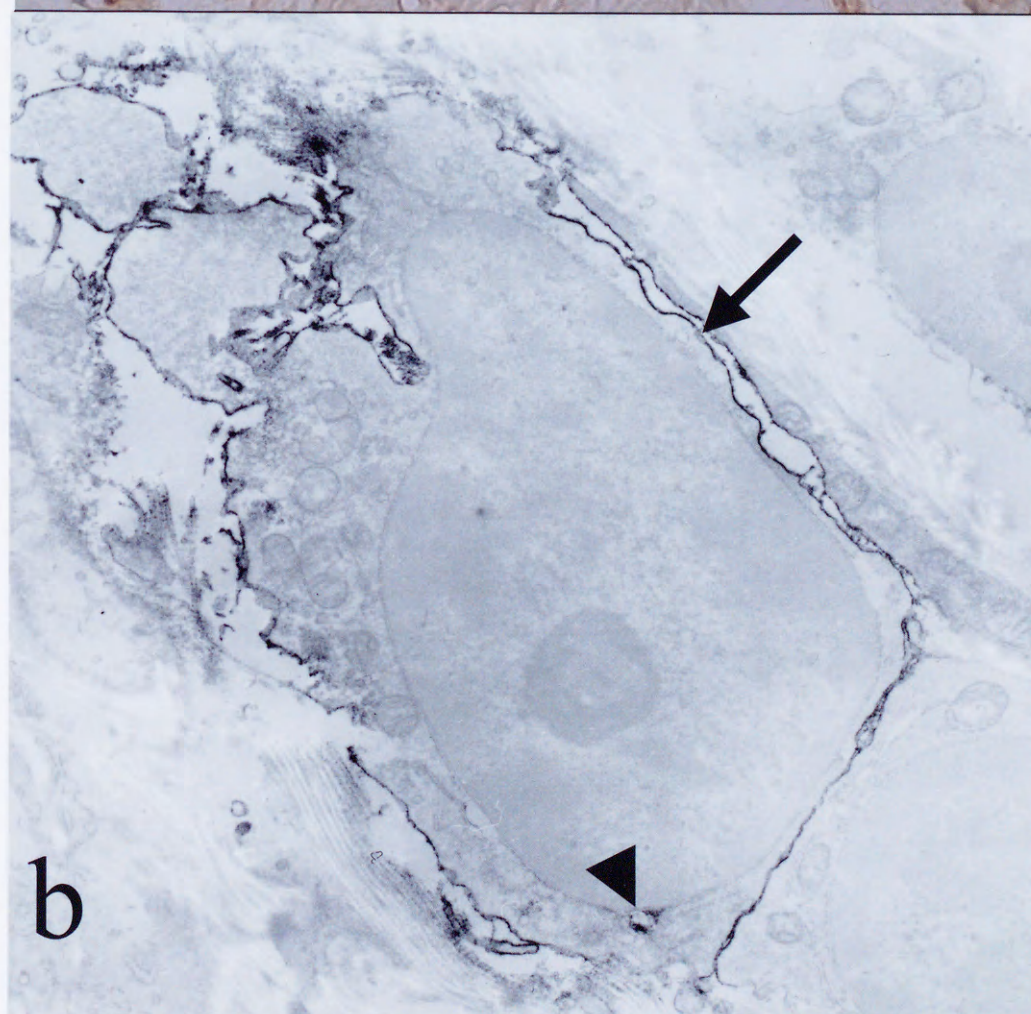
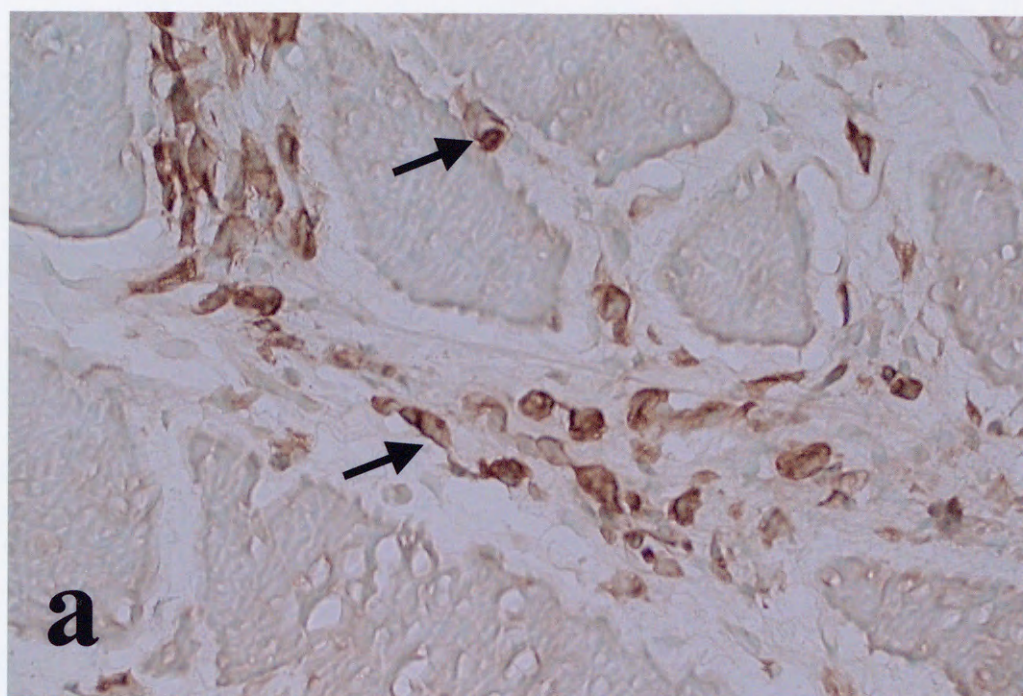


图 4

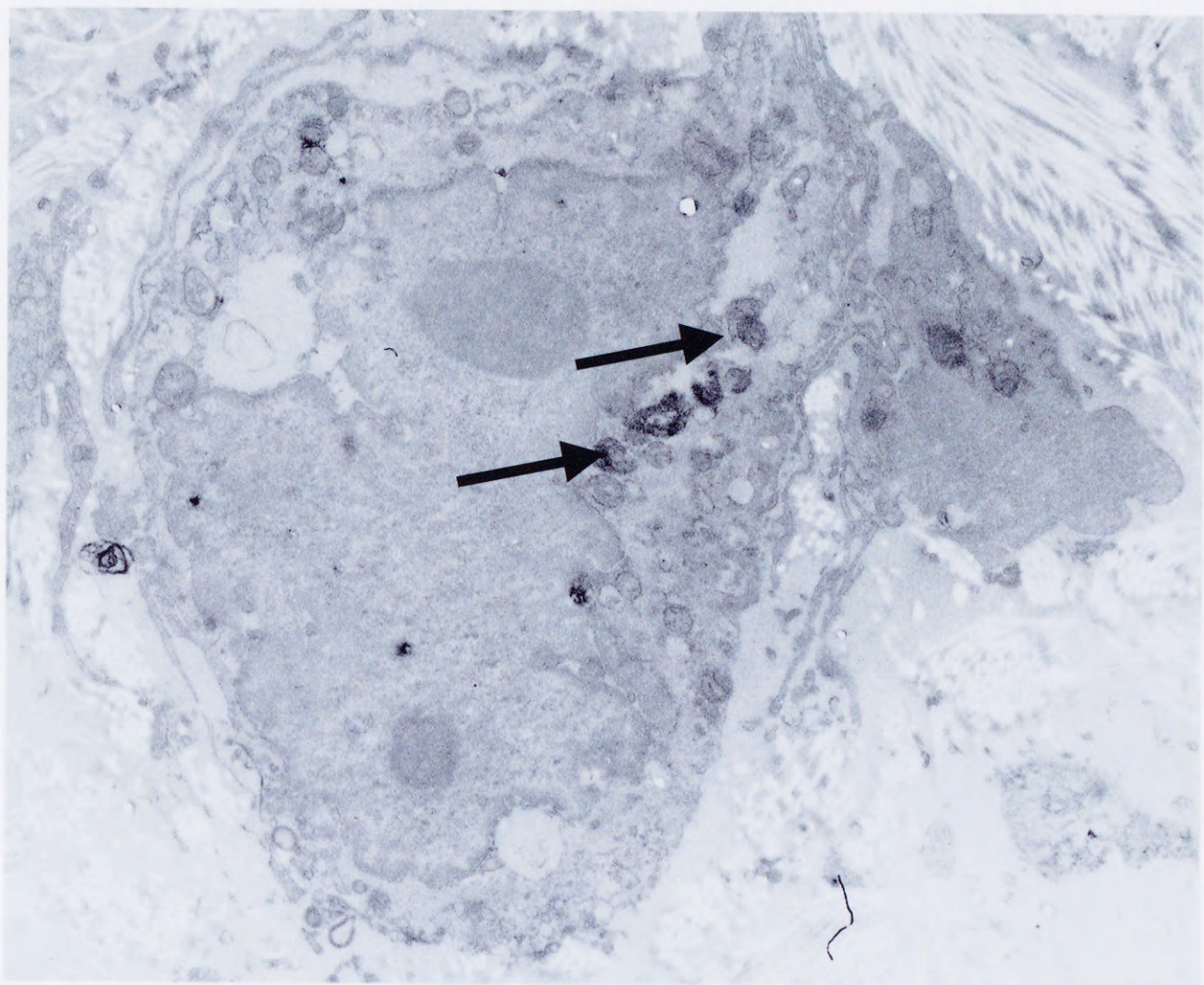


图5

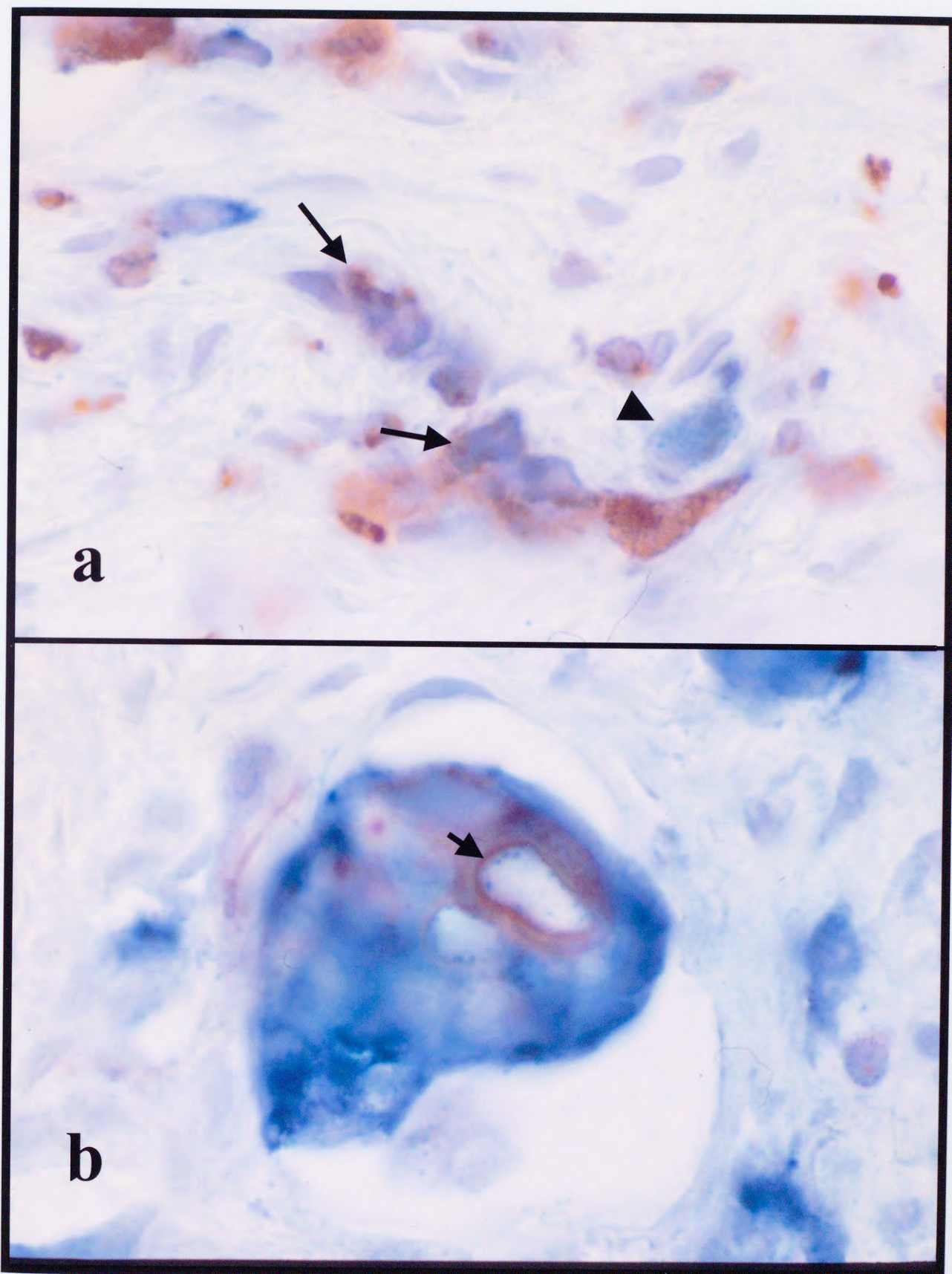


图6

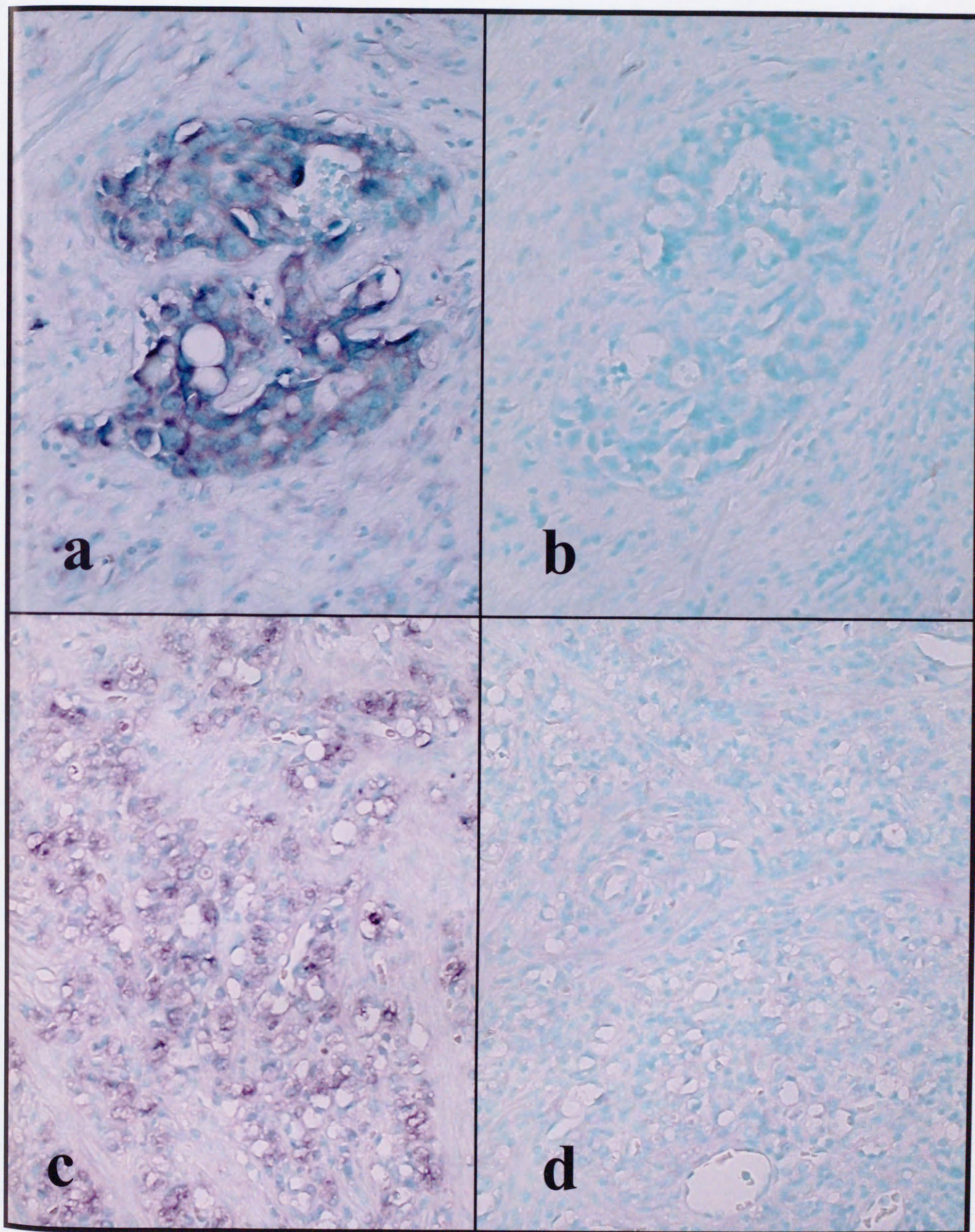
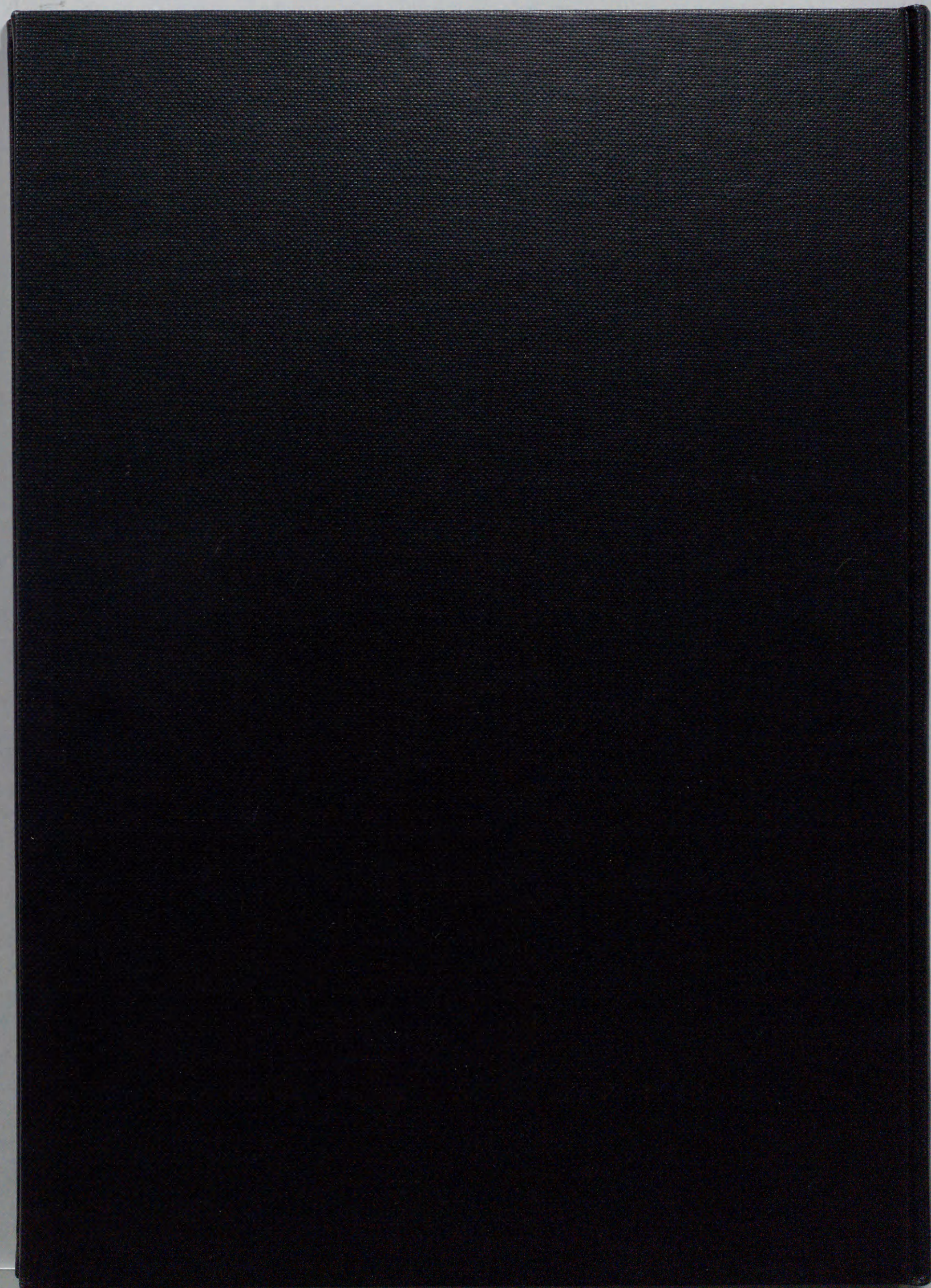


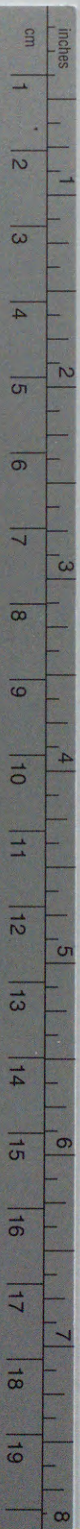
图7

図8

胃癌間質と創傷治癒過程の細胞外基質







Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

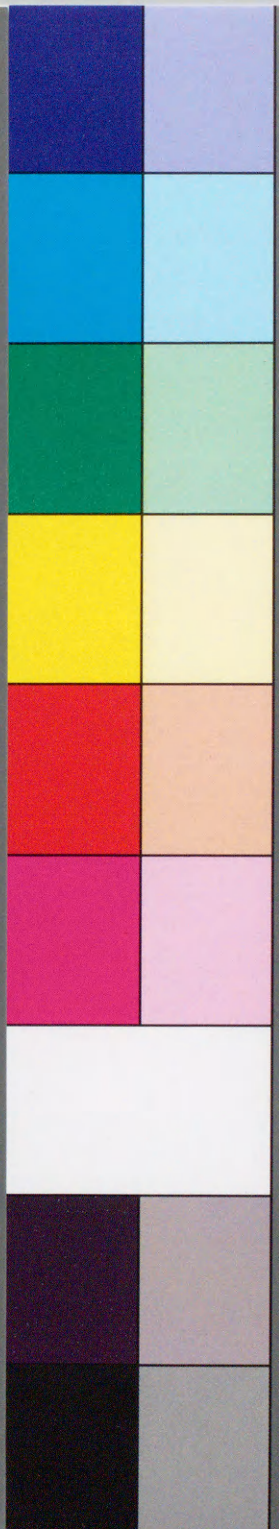
Red

Magenta

White

3/Color

Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

